

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y

Biotechnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR CON *PRIMERS* ESPECIFICOS–
DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE
LAS PCRs DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE AVIBIRNAVIRUS**

Tesis presentada por el Bachiller:

Pola Romero, Leidy Judith

para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotechnólogo

Asesora:

Mg. López Álvarez, Natalia

Co-Asesora:

Mg. Zavaleta Apestegui, Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20180000020139

N° Trámite en Fac. 382-2018

Fecha Recep. Fac. 23-04-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **POLA ROMERO, Leidy Judith**

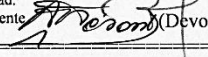
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR UNIVERSAL PARA ABIVIRNAVIRUS CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DEL PCR DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE IBVD"

DICTAMINADORES: **Blgo. Carlos Paz Aliaga**

2) Dra. Milagro Terán Dianderas

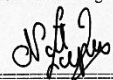
DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR UNIVERSAL PARA ABIVIRNAVIRUS CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DEL PCR DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **02. Mayo 2018**

ASESOR: **Mgter. Natalia López Álvarez**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LAS PCRs DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE ABIVIRNAVIRUS"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA 

FECHA **29/10/2019**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:


1) **Blgo Carlos Eitel Iván Paz Aliaga**

3) **Mgter. José Carpio Carpio**

2) **Dra. Milagro Terán Dianderas**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **25/11/2019**

JURADOS: PRESIDENTE **MAG. CARLOS JUAN PAZ ALIAGA**
VOCAL **DRA. MILAGRO TERÁN DIANDERAS**
SECRETARIO **MAG. JOSE CARPIO CARPIO**

FECHA **12/12/19**

HORA **19.00**

LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA **03 DIC 2019**

AGRADECIMIENTO

A Dios, por cuidarme, guiarme, fortalecer mi fe y estar presente en todo momento.

A mis padres, por el amor, comprensión y apoyo para cumplir mis metas en cada etapa de mi vida.

A la Universidad Católica de Santa María por plasmar en mí los conocimientos y valores necesarios para formarme como profesional y como persona.

A BTS consultores S.A.C. por brindarme la confianza para formar parte de su equipo de investigación, por impulsarme a crecer como profesional y por financiar el proyecto de investigación.

A mi asesora y co-asesora de tesis por su amistad, paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos que fortalecieron mi formación e hicieron posible la realización de este proyecto de tesis.

A todas las personas del laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del CITBM por su amistad, consejos y guía en el proceso de elaboración de mi tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	ii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	xii
OBJETIVOS	xiii
Objetivo general.....	xiii
Objetivos específicos	xiii
HIPÓTESIS.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. La enfermedad de la bursitis infecciosa	1
1.1.1. Etiología.....	1
1.1.2. Patología y signos clínicos.....	1
1.1.3. Propagación.....	3
1.1.4. Reseña histórica de incidencias	3
1.1.5. Control y prevención.....	3
1.2. Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa	4
1.3. Métodos convencionales de detección de IBDV.....	7
1.4. Extracción de ARN	7
1.4.1. Extracción basada en columna de afinidad.....	8
1.4.2. Método de extracción con Genezol.....	9
1.5. La reacción en cadena de la polimerasa	9
1.5.1. Transcripción inversa.....	10
1.5.2. RT-qPCR.....	12
CAPÍTULO II.....	13

2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Lugar de ejecución	13
2.1.1. Descripción del laboratorio	13
2.2. Materiales	13
2.2.1. Muestras	13
2.2.2. Kits	13
2.2.3. Equipos	14
2.2.4. Reactivos	14
2.2.5. Materiales de vidrio y otros	15
2.3. Métodos	15
2.3.1. Diseño de <i>primers</i> específicos-degenerados para IBDV	15
2.3.2. Obtención de ARN viral de IBDV	18
2.3.3. Optimización de la RT-PCR para detección de IBDV	20
2.3.4. Optimización de la RT-PCR para secuenciación de IBDV	22
2.3.5. Electroforesis	25
CAPÍTULO III	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Diseño de <i>primers</i> específicos-degenerados para IBDV	26
3.2. Análisis <i>in silico</i> de <i>primers</i> específicos – degenerados	27
3.3. Cuantificación de ARN por espectrofotometría	28
3.4. RT-qPCR para la comparación de métodos de extracción de ARN	30
3.5. Comparación de enzimas de transcripción inversa y uso de DMSO	31
3.6. Comparación entre <i>primers</i> específicos-degenerados y hexámeros aleatorios.	32
3.7. RT-PCR para la secuenciación parcial del segmento A con muestras de bursas positivas para IBDV	34
3.8. RT-PCR para la secuenciación Parcial del segmento B con muestras de	

bursas positivas para IBDV	35
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS.....	44



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Primers específicos – degenerados de longitud corta	17
Tabla 2.- Primers específicos – degenerados de longitud normal	17
Tabla 3.- Secuencias de primers de detección de IBDV(53).....	21
Tabla 4.- Protocolo de amplificación de la RT-qPCR para detección de IBDV	21
Tabla 5.- Protocolo de amplificación de la PCR de detección de IBDV	22
Tabla 6.- Secuencias de primers de secuenciación de IBDV	24
Tabla 7.- Protocolo de amplificación de la PCR de secuenciación parcial del segmento A y B.....	24
Tabla 8. Análisis de parámetros de primers específicos–degenerados de longitud corta...	27
Tabla 9. Análisis de parámetros de primers específicos – degenerados de longitud entre 18 a 21 pares.....	28
Tabla 10. Cuantificación de ARN por NanoDrop One	29
Tabla 11.- Datos de análisis de qPCR de detección comparando métodos de extracción ..	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (23).....	5
Figura 2. Marcos de lectura del segmento A y B (23).....	5
Figura 3. Alineamiento de secuencias blanco de IBDV en el programa Mega 7.0 (foto propia).....	16
Figura 4. Primers específico - degenerados anclados en el segmento A.....	26
Figura 5. Primers específico - degenerados anclados en el segmento B	26
Figura 6. Curva estandar (10^4 - 10^6) de la RT-qPCR de detección de IBDV. Se muestran valores del coeficiente de correlación (R^2), el intercepto (B) y la eficiencia (E)	30
Figura 7. Curva de amplificación de la RT-qPCR de detección de IBDV	30
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de RT-PCR de detección de IBDV comparando enzimas retro-transcriptasas (AMV y M-MuLV) y uso de DMSO en la desnaturalización de ARN	32
Figura 9. Comparación de primers específicos-degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR detección de IBDV	33
Figura 10. Comparación de primers específicos degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR de secuenciación parcial del segmento A de IBDV	33
Figura 11. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento A de muestras positivas de IBDV.	34
Figura 12. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento B de muestras positivas de IBDV.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNbc: ARN de doble cadena

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales

BLASTx: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales, para el análisis de aminoácidos traducidos de una cadena de ADN.

CDS: Secuencia codificante de ADN

DMSO: Dimetil sulfóxido

IBDV: Virus de la Bursitis Infecciosa del inglés Infectious Bursal disease virus

NCBI: Del inglés National Center for Biotechnology Information

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

R.H: Random Hexamers

RT-PCR: Transcripción Reversa-PCR

RESUMEN

La enfermedad infecciosa de la bursa (o enfermedad de Gumboro) afecta a nuestro país causando grandes pérdidas económicas en los planteles avícolas (1). La detección, control y prevención de esta enfermedad es complicada debido a la capacidad infectiva, resistencia y alta variabilidad del virus. Las pruebas existentes para la detección y clasificación del virus han sido útiles para el estudio de la evolución de la enfermedad, no obstante, presentan dificultades con el manejo de los virus de campo en las granjas avícolas.

Por dichas razones, en este estudio se evaluó a la técnica de la RT-PCR con *primers* específicos-degenerados para incrementar la sensibilidad de la PCR como prueba de diagnóstico y la PCR como técnica de secuenciación para IBDV. Las muestras evaluadas fueron una vacuna y bursas infectadas con IBDV. Se evaluaron distintos aspectos en el diseño de la RT-PCR y en la elección del método de extracción. Se realizaron las PCRs de diagnóstico y secuenciación de IBDV para seleccionar el mejor par de *primers* específicos-degenerados los cuales fueron R6 con F11 para el segmento A y R7 con F12 para el segmento B. Se compararon dos tipos de enzimas transcriptasas inversas (M-MuLV y AMV), obteniendo mejores resultados con la enzima M-MuLV y agregando DMSO al 20%. Además se evaluaron las condiciones finales para la RT-PCR, mediante PCR de secuenciación parcial del segmento A y B, demostrando que el mix de los *primers*

específicos–degenerados junto con hexámeros aleatorios amplifica satisfactoriamente ARN proveniente de tejido de bursas. En conclusión, la RT-PCR diseñada con *primers* específicos-degenerados en conjunto con los hexámeros aleatorios incrementó la sensibilidad de la PCR de diagnóstico y secuenciación de IBDV.

Palabras Clave:

Bursa, RT-PCR, IBDV, secuenciación, ARN, DMSO, transcriptasas, M-MuLV, degenerados, hexámeros aleatorios.



ABSTRACT

The infectious bursal disease (or Gumboro disease) affects our country causing big economic losses in poultry farms (1). The detection, control and prevention of this disease is complicated due to the infective capacity, resistance and high variability of the virus. Current tests for the detection and classification of the virus have been useful for the study of the evolution of the disease, however, they present difficulties with the management of field viruses in poultry farms.

For these reasons, in this study the RT-PCR technique was evaluated with degenerate-specific primers to increase the sensitivity of the PCRs as a diagnostic and sequencing test for IBDV. The samples evaluated were a vaccine and stock infected with IBDV. Different aspects were evaluated in the design of the RT-PCR and the choice of the extraction method. IBDV diagnostic and sequencing PCRs were performed to select the best pair of degenerate-specific primers which were R6 with F11 for segment A and R7 with F12 for segment B. Two types of reverse transcriptase enzymes were compared, obtaining better results with the M-MuLV enzyme and adding 20% DMSO. In addition, the final conditions for RT-PCR were evaluated with partial sequencing PCR of segment A and B, demonstrating that the mix of specific-degenerated primers together with random hexamers successfully amplifies RNA from stock tissue. In conclusion, RT-PCR designed with degenerate-specific primers in conjunction with random hexamers increased the sensitivity of the diagnosis and sequencing PCR of IBDV.

Keywords:

Bursa, RT-PCR, IBDV, sequencing, RNA, DMSO, transcriptases, M-MuLV, degenerates, random hexamers.